



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0101914
(43) 공개일자 2022년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08G 65/329 (2006.01) A61K 47/34 (2017.01)
A61K 47/69 (2017.01) A61K 9/107 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C08G 65/26 (2006.01) C08G 81/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08G 65/329 (2013.01)
A61K 47/34 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0003974
(22) 출원일자 2021년01월12일
심사청구일자 2021년01월12일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
김병수
서울특별시 서대문구 가재울미래로 2, 130동 901호(남각좌동, DMC파크뷰자이)
손일오
대구광역시 북구 대현로10길 82, 106동 301호(대현동, 대현 e-편한세상)
(74) 대리인
특허법인충현

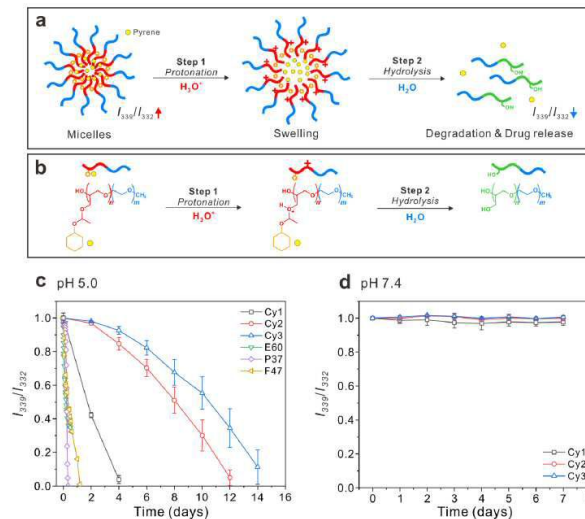
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 pH 감응형 양친성 블록 공중합체, 이의 제조방법, 상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체를 포함하는 고분자 마이셀

(57) 요약

본 발명은 pH 감응형 양친성 블록 공중합체, 이의 제조방법, 상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체를 포함하는 고분자 마이셀에 관한 것으로, 보다 상세하게는 친수성 고분자의 일 말단에 소수성을 갖는 폴리사이클로헥실옥시 에틸글리시딜에테르(PCHGE)를 공중합함으로써 CHGE의 강력한 분자 간 소수성 상호 작용에 의해 캡슐화가 가능한 자기조립 고분자 마이셀을 형성할 수 있으며, 인체 안정성이 우수한 이점이 있다. 또한 이를 이용한 고분자 마이셀은 우수한 캡슐화 안정성 및 생체 적합성을 가지며, CHGE의 pH에 반응하는 아세트알 결함으로 인해 pH를 조절하거나 CHGE 단량체의 수를 조절함으로써 마이셀의 분해속도를 제어하여 효과적으로 약물이 방출될 수 있도록 조절할 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 47/6907 (2017.08)

A61K 9/1075 (2013.01)

A61K 9/5031 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C08G 65/26 (2013.01)

C08G 81/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2020110205
과제번호	2017R1A2B3012148
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	기능성 에폭시 단량체 라이브러리 기반 차세대 폴리에테르 합성 및 응용
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2017.06.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

친수성 고분자의 일 말단에 소수성을 갖는 폴리사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(PCHGE)가 음이온 개환 중합에 의해 공중합된 pH 감응형 양친성 블록 공중합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

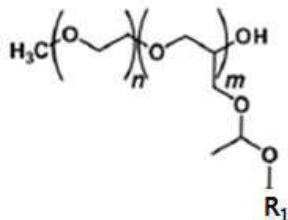
상기 친수성 고분자는 폴리(에틸렌글리콜)메틸에테르, 폴리에틸렌글리콜다이아크릴레이트, 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌이미드, 폴리아미노산, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리비닐알코올, 폴리아크릴산 및 폴리비닐피롤리돈으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인 pH 감응형 양친성 블록 공중합체.



청구항 3

제1항에 있어서,

상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체는 하기 화학식 1로 표시되는 폴리(에틸렌글리콜)메틸에테르-블록-폴리사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(PEG-b-PCHGE)인 것인 pH 감응형 양친성 블록 공중합체.

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서, R_1 은 수소, 탄소수 1 내지 4의 알킬기, 사이클기() 또는 페닐기()이고, 상기 R_2 는 CH_3 , CH_2CH_3 또는 $-NH_2$ 이고, n 과 m 은 각 반복단위의 반복수로서, n 은 50 내지 200의 정수이고, m 은 3 내지 46의 정수이며, $n:m$ 은 1: 0.01 내지 1: 0.9이다.)

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체는 수평균분자량(M_n , NMR)이 6,000 내지 20,000 g/mol이고, 분자량 분산도(M_w/M_n)가 1.08 내지 1.19이며, 유리전이온도(T_g)가 -40 내지 -25 °C인 것인 pH 감응형 양친성 블록 공중합체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체는 임계마이셀농도(CMC)가 1.4 내지 13 mg/L인 것인 pH 감응형 양친성 블록 공중합체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체는 pH가 7.2 내지 7.6 범위인 경우 자기조립 마이셀(micelle)을 형성하며, pH가 1 내지 5 범위인 경우 마이셀이 붕괴되는 것인 pH 감응형 양친성 블록 공중합체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 pH 감응형 양친성 블록 공중합체; 및

상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체의 폴리사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(PCHGE)에 결합된 분자영상 표지자, 조영제 또는 치료제 물질;을 포함하는 고분자 마이셀.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 분자영상 표지자는 피렌(pyrene), 피렌부티릭산(Pyrenebutyric acid), 피렌메틸아민(Pyrene methylamine), 아미노피렌(1-Aminopyrene), 피렌보로닉산(Pyrene-1-boronic acid), 산화철 및 산화망간으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상인 것인 고분자 마이셀.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 치료제 물질은 펩타이드, 단백질, 항암제, 소염진통제, 항생제, 항균제, 호르몬제, 유전자 및 백신으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인 고분자 마이셀.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 고분자 마이셀은 평균 직경이 20 내지 200 nm인 것인 고분자 마이셀.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 고분자 마이셀은 경구, 경피, 눈, 피하, 정맥내, 근육내 또는 복강내 경로를 통해 투여될 수 있도록 주사용, 경피용 또는 경구용으로 제형화되는 것인 고분자 마이셀.

청구항 12

제7항에 따른 고분자 마이셀을 포함하는 pH 감응형 표적 전달체.

청구항 13

사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(CHGE)를 합성하는 단계; 및

유기용매에 친수성 고분자, 상기 사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(CHGE) 및 촉매를 투입하고, 음이온 개환 중합시켜 pH 감응형 양친성 블록 공중합체를 제조하는 단계;를 포함하는 pH 감응형 양친성 블록 공중합체의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체를 제조하는 단계는 상기 친수성 고분자 및 사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(CHGE)를 1: 5 내지 60 몰비로 혼합하는 것인 pH 감응형 양친성 블록 공중합체의 제조방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체를 제조하는 단계는 50 내지 100 ℃에서 10 내지 30 시간 동안 중합하는 것인 pH 감응형 양친성 블록 공중합체의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 pH 감응형 양친성 블록 공중합체, 이의 제조방법, 상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체를 포함하는 고분자 마이셀에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 화학요법은 암을 치료하는 가장 일반적인 수단으로 사용된다. 그러나 높은 독성, 빠른 제거 및 종양 선택성과 같은 치료제의 본질적인 한계를 극복하기 위해 향상된 효율성을 가진 새로운 약물 전달 시스템을 개발하는 것이 매우 중요하다. 이를 해결하기 위해 고분자 약물 집합체, 리포솜 및 고분자 마이셀을 포함한 고분자 약물 운반체에 대한 연구개발이 이루어졌다.

[0003] 이 중 고분자 마이셀은 고도로 조정 가능한 로딩 효율 및 용량, 손쉬운 변형, 순환계의 긴 순환 시간, 방출 부작용 및 조정 가능한 분해 역학과 같은 고유한 장점을 가진 이상적인 약물전달 담체로 널리 사용되고 연구되었다. 이러한 고분자 마이셀은 효율적인 약물전달을 위해 큰 발전을 이루었지만 이를 적용한 안정성 문제는 해결해야 될 과제이다.

[0004] 생물학적 환경에서 약물 운반체의 안정성은 매우 중요하다. 생물학적 매개체와 접촉하는 다양한 단백질 성분의 흡착은 운반체의 안정성에 부정적인 영향을 미치고 약물전달의 효과가 저하되는 요인이 된다. 또한 동적 평형 이동으로 인해 혈류에서 고분자 마이셀의 안정성이 저하되기도 한다. 이러한 문제를 해결하기 위해 소수성, 정전기, 숙주-게스트, 수소 결합, 입체 복합체, 배위 상호작용과 같은 비공유 상호작용을 고분자 마이셀에 도입할 경우 고분자 마이셀의 안정성을 향상시킬 수 있다.

[0005] 기존 문헌에서는 양친성 공중합체의 소수성을 향상시키기 위해 환원 반응을 갖는 고분자 마이셀인 이황화결합 가교 테옥시콜산-히알루론산을 합성하였다. 상기 고분자 마이셀은 글루타티온의 존재 하에서 분해되고 가속화된 소수성 약물 방출을 나타내었다. 또 다른 문헌에서 합성된 스테아레이트-g-텍스트란 그래프트 공중합체는 소수성 스테아레이트의 그래프팅 정도가 다른데, 상기 소수성 스테아레이트의 비율이 증가함에 따라 로딩 용량 및 캡슐화 효율은 증가하고 크기는 감소하였다. 또한 양친성 어셈블리 내 소수성 분자의 캡슐화는 소수성과 관련이 있다. 이에 따라 자체 조립된 마이셀 코어의 소수성을 증가시키면 소수성 치료제와의 상호 작용이 향상되고 부하 용량과 효율성을 향상시킬 수 있다.

[0006] 이 밖에도 정교한 전달은 DDS의 또 다른 중요한 요소이다. pH, 산화 환원, 효소 또는 단백질, 핵산과 같은 다양

한 내인성 자극에 반응하는 특정 화학적 작용기를 가진 고분자 마이셀은 치료 화합물을 전달하고 질병 부위에서 약물 방출을 제어하기 위해 개발되었다. 여기에 암세포의 산성 미세환경으로 인해 케탈, 아세탈, 히드라존 및 오르토에스테르 에스테르와 같은 산 불안정 결합을 가진 pH 반응성 마이셀이 사용되었다.

[0007] 약물 전달을 위한 새로운 기능성 에폭시드 모노머로 테트라하이드로푸라닐글리시딜에테르(TFGE), 테트라하이드로피라닐글리시딜에테르(TPGE)를 포함하여 아세탈 그룹을 갖는 일련의 pH 반응성 글리시딜 에테르를 합성하였다. 그러나 TFGE 및 TPGE 단량체를 기반으로 한 고분자 마이셀은 약물 운반체로는 성공적이었으나, 치료제의 부작용을 줄이기 위한 고용량과 인체 안정성을 달성하는 것은 여전히 해결 과제로 남아있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2187144호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 상기와 같은 문제 해결을 위하여, 본 발명은 자기조립 마이셀 형성이 가능한 pH 감응형 양친성 블록 공중합체를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0010] 또한 본 발명은 상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체를 포함하여 캡슐화 안정성 및 생체 적합성이 우수한 고분자 마이셀을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0011] 또한 본 발명은 상기 고분자 마이셀을 포함하는 pH 감응형 표적 전달체를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0012] 또한 본 발명은 pH 감응형 양친성 블록 공중합체의 제조방법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 친수성 고분자의 일 말단에 소수성을 갖는 폴리사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(PCHGE)가 음이온 개환 중합에 의해 공중합된 pH 감응형 양친성 블록 공중합체를 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체; 및 상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체의 폴리사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(PCHGE)에 결합된 분자영상 표지자, 조영제 또는 치료제 물질;을 포함하는 고분자 마이셀을 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 상기 고분자 마이셀을 포함하는 pH 감응형 표적 전달체를 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은 사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(CHGE)를 합성하는 단계; 및 유기용매에 친수성 고분자, 상기 사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(CHGE) 및 촉매를 투입하고, 음이온 개환 중합시켜 pH 감응형 양친성 블록 공중합체를 제조하는 단계;를 포함하는 pH 감응형 양친성 블록 공중합체의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 pH 감응형 양친성 블록 공중합체는 친수성 고분자의 일 말단에 소수성을 갖는 폴리사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(PCHGE)를 공중합함으로써 CHGE의 강력한 분자 간 소수성 상호 작용에 의해 캡슐화가 가능한 자기조립 고분자 마이셀을 형성할 수 있으며, 인체 안정성이 우수한 이점이 있다.

[0018] 또한 본 발명에 따른 고분자 마이셀은 우수한 캡슐화 안정성 및 생체 적합성을 가지며, CHGE의 pH에 반응하는 아세탈 결합으로 인해 pH를 조절하거나 CHGE 단량체의 수를 조절함으로써 마이셀의 분해속도를 제어하여 효과적으로 약물이 방출될 수 있도록 조절할 수 있다.

[0019] 본 발명의 효과는 이상에서 언급한 효과로 한정되지 않는다. 본 발명의 효과는 이하의 설명에서 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 할 것이다.

도면의 간단한 설명

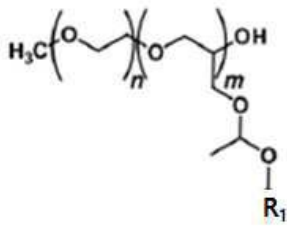
- [0020] 도 1은 본 발명의 실시예 1 및 비교예 1에서 제조된 CHGE 모노머(a), PCHGE 호모폴리머(b) 및 mPEG-b-PCHGE 블록 공중합체(c)의 ¹H NMR 스펙트럼 분석 결과이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예 1에서 제조된 mPEG-b-PCHGE 블록 공중합체에 대한 2750에서 4500 Da까지의 MALDI-ToF 질량 스펙트럼 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 다양한 모델 아세탈 측쇄 화합물(CHPE, TPPE, TFPE, EEPE)의 가수분해 반응 좌표의 에너지 다이어그램(a)과 CHPE의 제안된 가수분해 메커니즘(b)을 계략적으로 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 실시예 1에서 제조된 Cy1, Cy2 및 Cy3 마이셀의 강도 평균 유체 역학적 직경(Dh) 분포도(a-c)와 해당 라인 스캔 프로파일이 있는 Cy1, Cy2 및 Cy3 마이셀의 AFM 이미지(d-f)이다.
- 도 5는 본 발명의 실시예 1의 Cy1, Cy2 및 Cy3과 비교예 2 내지 4의 E60, P37, F47에서 Nile Red의 캡슐화 효율(a)과 상기 Cy1, Cy2 및 Cy3의 캡슐화 효율에 대한 실제 이미지(b)를 각각 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명의 실시예 1에서 제조된 Cy1, Cy2, Cy3과 비교예 2 내지 4의 E60, P37, F47을 이용하여 pyrene 형광법에 기반한 약물방출 프로파일의 도식화(a) 및 화학구조 변화(b)와 pH 5.0 및 pH 7.4에서의 피렌이 로딩된 상기 실시예 1에서 제조된 Cy1, Cy2, Cy3과 비교예 2 내지 4의 E60, P37, F47를 이용한 마이셀의 약물방출 동역학(c, d)을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 본 발명의 실시예 1에서 제조된 Cy1, Cy2, Cy3에 대하여 형광 방출 스펙트럼($\lambda_{ex} = 450 \text{ nm}$)을 사용하여 PBS 및 FBS에서의 FRET 기반 캡슐화 안정성 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 본 발명의 실시예 1에서 제조된 Cy1, Cy2, Cy3에 대하여 HeLa 세포를 사용한 MTT 분석에 의해 결정된 시험관 내 세포 생존력 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용



- [0021] 이하에서는 본 발명을 하나의 실시예로 더욱 상세하게 설명한다.
- [0022] 본 발명은 pH 감응형 양친성 블록 공중합체, 이의 제조방법, 상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체를 포함하는 고분자 마이셀에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명에 따른 pH 감응형 양친성 블록 공중합체는 친수성 고분자의 일 말단에 소수성을 갖는 폴리사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(PCHGE)를 공중합하여 pH 감응형 양친성 블록 공중합체를 제조함으로써 CHGE의 강력한 분자 간 소수성 상호 작용에 의해 캡슐화가 가능한 자기조립 고분자 마이셀을 형성할 수 있으며, 인체 안정성이 우수한 이점이 있다. 이 밖에도 상기 양친성 블록 공중합체는 높은 소수성을 갖는 CHGE로 인해 로딩 효율이 우수하다. 나아가 이를 이용하여 폴리에테르 기반 바이오 분야로의 응용 가능하다.
- [0024] 또한 본 발명에 따른 고분자 마이셀은 우수한 캡슐화 안정성 및 생체 적합성을 가지며, CHGE의 pH에 반응하는 아세탈 결합으로 인해 pH를 조절하거나 CHGE 단량체의 수를 조절함으로써 마이셀의 분해속도를 제어하여 효과적으로 약물이 방출될 수 있도록 조절할 수 있다. 예컨대, 상기 고분자 마이셀은 37 °C에서 최대 14 일 동안 지속되어 분해 역학의 지속 방출 및 조절이 가능할 수 있다. 또한 상기 고분자 마이셀의 우수한 생체 적합성은 약물전달 담체로서 응용 가능한 이점이 있다.
- [0025] 본 발명은 친수성 고분자의 일 말단에 소수성을 갖는 폴리사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(PCHGE)가 음이온 개환 중합에 의해 공중합된 pH 감응형 양친성 블록 공중합체를 제공한다.
- [0026] 상기 친수성 고분자는 인체 안정성이 우수한 고분자일 수 있고, 구체적인 예는 폴리(에틸렌글리콜)메틸에테르, 폴리에틸렌글리콜다이아크릴레이트, 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌이미드, 폴리아미노산, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리비닐알코올, 폴리아크릴산 및 폴리비닐피롤리돈으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 바람직하게는 폴리(에틸렌글리콜)메틸에테르, 폴리에틸렌글리콜다이아크릴레이트, 폴리에틸렌글리콜 및 폴리에틸렌옥사이드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 가장 바람직하게는 폴리(에틸렌글리콜)메틸에테르일 수 있다.
- [0027] 상기 폴리사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(PCHGE)는 에폭시 모노머를 포함하고 있어 소수성을 띄며, 분자 간 소수성 상호 작용에 의해 캡슐화가 가능한 특성이 있다. 또한 고분자 마이셀 형성 시 상기 폴리사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(PCHGE)에 피렌계 유기물, 분자영상 표지자, 조영제 또는 치료제 물질 등의 다양한 생리 활성 성분들이 화학적으로 결합되어 고분자 마이셀의 코어 부분에 위치할 수 있다.


[0028] 상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체는 하기 화학식 1로 표시되는 폴리(에틸렌글리콜)메틸에테르-블록-폴리사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(PEG-b-PCHGE)일 수 있다.


[0029] [화학식 1]



[0030]

[0031] (상기 화학식 1에서, R₁은 수소, 탄소수 1 내지 4의 알킬기, 사이클기() 또는 페닐기()이고, 상기 R₂는 CH₃, CH₂CH₃ 또는 -NH₂이고, n과 m은 각 반복단위의 반복수로서, n은 50 내지 200의 정수이고, m은 3 내지 46의 정수이며, n:m은 1: 0.01 내지 1: 0.9이다.)

[0032] 바람직하게는 상기 화학식 1에서, R₁은 사이클기()이고, n은 70 내지 180의 정수이고, m은 3 내지 46의 정수이며, n:m은 1:0.06 내지 1: 0.7일 수 있다. 더욱 바람직하게는 상기 화학식 1에서, n은 90 내지 160의 정수이고, m은 18 내지 35의 정수이며, n:m은 1:0.1 내지 1: 0.5일 수 있다. 가장 바람직하게는 상기 화학식 1에서,

R₁은 사이클기()이고, n은 110 내지 120의 정수이고, m은 26 내지 30의 정수이며, n:m은 1:0.2 내지 1:0.3일 수 있다. 특히, 상기 폴리사이클로헥실옥시시테틸글리시딜에테르(PCHGE)의 반복수가 3 미만이면 수평균분자량 및 유리전이온도가 현저하게 저하되고, 소수성 상호작용이 급격하게 떨어져 고분자 마이셀 형성이 어려울 수 있고, 반대로 46 초과이면 마이셀 형성에 사용되는 고분자 양이 적어질 수 있다.

[0033] 상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체는 수평균분자량(M_n , NMR)이 6,000 내지 20,000 g/mol이고, 분자량 분산도 (M_w/M_n)가 1.08 내지 1.19이며, 유리전이온도(T_g)가 -40 내지 -25 °C일 수 있다. 상기 수평균분자량은 바람직하게는 6,400 내지 14,000 g/mol, 더욱 바람직하게는 8,500 내지 12,000 g/mol, 가장 바람직하게는 9,800 내지 11,000 g/mol일 수 있다. 상기 분자량 분산도는 바람직하게는 1.09 내지 1.13, 가장 바람직하게는 1.1 내지 1.12일 수 있다. 또한 상기 유리전이온도(T_g)는 바람직하게는 -35.3 내지 -28.6 °C, 가장 바람직하게는 -31 내지 -29.5 °C일 수 있다.

[0034] 이때, 상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체는 수평균분자량, 분자량 분산도 및 유리전이온도가 상기 물성 범위를 모두 만족할 때 고분자 마이셀의 평균 직경이 고르게 형성되어 균일한 약물 담지 효율을 확보할 수 있으며, 일정한 분해 속도를 유지할 수 있다.

[0035] 상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체는 임계마이셀농도(CMC)가 1.4 내지 13 mg/L, 바람직하게는 1.64 내지 9.49 mg/L, 더욱 바람직하게는 1.91 내지 5.24 mg/L, 가장 바람직하게는 2.13 내지 2.81 mg/L일 수 있다.

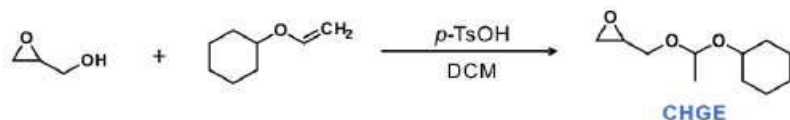
[0036] 상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체는 pH가 7.2 내지 7.6 범위인 경우 자기조립 마이셀(micelle)을 형성하며, pH가 1 내지 5 범위인 경우 마이셀이 붕괴될 수 있다. 상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체는 체내 정상 세포의 pH 범위인 pH가 7.2 내지 7.6에서는 안정한 마이셀을 형성하고, 암 세포와 같은 비정상 세포가 나타내는 pH 7.0 이하인 경우 상기 마이셀 구조가 붕괴됨으로써 마이셀에 화학적으로 결합된 진단제의 방출로 인해 암 세포를 표적적으로 진단하고, 그에 따른 치료를 위한 치료제의 약물 방출용 캐리어로서의 역할을 할 수 있다. 즉, pH가 1 내지 5 범위인 산성 환경에서는 상기 양친성 블록 공중합체 내 CHGE의 pH에 반응하는 아세탈 결합이 가수분해 되어 이중 친수성기(double hydrophilic)를 가지면서 마이셀이 붕괴될 수 있다. 즉, 상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체는 pH를 조절함에 따라 고분자 마이셀의 분해 속도를 제어할 수 있다.

[0037] 한편, 본 발명은 pH 감응형 양친성 블록 공중합체; 및 상기 pH 감응형 양친성 블록 공중합체의 폴리사이클로헥

실옥시에틸글리시딜에테르(PCHGE)에 결합된 분자영상 표지자, 조영제 또는 치료제 물질;을 포함하는 고분자 마이셀을 제공한다.

- [0038] 상기 고분자 마이셀은 체내에 주입되었을 때 마이셀을 형성하고 있다가 암세포와 같이 국소적으로 pH가 낮은 곳에 도달하게 되면 마이셀이 붕괴됨으로써, 내포된 질환의 진단을 위한 분자영상 표지자, 조영제 또는 질환의 치료를 위한 치료제 물질을 방출하여 표적지향적 약물 전달이 가능한 이점이 있다.
- [0039] 상기 분자영상 표지자는 질환의 진단을 위한 것으로서 피렌(pyrene), 피렌부티릭산(Pyrenebutyric acid), 피렌 메틸아민(Pyrene methylamine), 아미노피렌(1-Aminopyrene), 피렌보로닉산(Pyrene-1-boronic acid), 산화철 및 산화망간으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 피렌일 수 있다.
- [0040] 상기 치료제 물질은 질환의 치료를 위한 것으로서 펩타이드, 단백질, 항암제, 소염진통제, 항생제, 항균제, 호르몬제, 유전자 및 백신으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 상기 고분자 마이셀은 평균 직경이 20 내지 200 nm, 바람직하게는 26 내지 119 nm, 더욱 바람직하게는 60 내지 105 nm, 가장 바람직하게는 82 내지 87 nm일 수 있다. 이때, 상기 고분자 마이셀의 평균 직경이 20 nm 미만이면 코어 내부에 충분한 함량의 약물을 담지하는 것이 어려울 수 있고, 반대로 200 nm 초과이면 친수성 고분자 쉘과 대비하여 소수성 코어인 CHGE의 지나친 증가로 마이셀 형태가 붕괴될 수 있다.
- [0042] 상기 고분자 마이셀은 경구, 경피, 눈, 피하, 정맥내, 근육내 또는 복강내 경로를 통해 투여될 수 있도록 주사용, 경피용 또는 경구용으로 제형화되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 또한, 본 발명은 상기 고분자 마이셀을 포함하는 pH 감응형 표적 전달체를 제공한다.
- [0044] 또한, 본 발명은 사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(CHGE)를 합성하는 단계; 및 유기용매에 친수성 고분자, 상기 사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(CHGE) 및 촉매를 투입하고, 음이온 개환 중합시켜 pH 감응형 양친성 블록 공중합체를 제조하는 단계;를 포함하는 pH 감응형 양친성 블록 공중합체의 제조방법을 제공한다.
- [0045] 상기 사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(CHGE)를 합성하는 단계는 디클로로메탄 용매에 글리시돌과 사이클로헥실비닐에테르를 투입하고, 중합시켜 합성되는 것일 수 있다.
- [0046] 상기 양친성 블록 공중합체를 제조하는 단계는 상기 친수성 고분자 및 사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(CHGE)를 1: 5 내지 60 몰비, 바람직하게는 1: 10 내지 55 몰비, 더욱 바람직하게는 1: 45 내지 50 몰비, 가장 바람직하게는 1: 25 내지 35 몰비로 혼합할 수 있다. 특히, 상기 사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(CHGE)가 5 몰비 미만이면, 소수성 상호작용이 너무 약하여 마이셀 형성이 어려울 수 있고, 반대로 60 몰비 초과이면 소수성 상호작용이 너무 강하여 마이셀 분해가 지연될 수 있다.
- [0047] 상기 촉매는 t-BuP₄, t-BuP₁ 및 EtP₂로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 t-BuP₄일 수 있다.
- [0048] 상기 양친성 블록 공중합체를 제조하는 단계는 50 내지 100 °C에서 24 내지 72 시간, 바람직하게는 52 내지 70 °C에서 30 내지 68 시간, 가장 바람직하게는 55 내지 65 °C에서 46 내지 50 시간 동안 중합할 수 있다. 이때, 상기 중합온도 및 중합시간 조건을 모두 만족하지 않는 경우 상기 친수성 고분자와 CHGE간의 가교 결합이 충분히 일어나지 않거나, 과도한 가교 결합에 의해 수득된 양친성 블록 공중합체의 열적 및 화학적 안정성이 저하될 수 있다.
- [0049] 이하 본 발명을 실시예에 의거하여 더욱 구체적으로 설명하겠는 바, 본 발명이 다음 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0050] **실시예 1**
- [0051] (1) 재료
- [0052] 모든 시약과 용매는 Sigma-Aldrich, Alfa Aesar 또는 Tokyo Chemical Industry에서 구입했으며, 달리 명시하지 않는 한 그대로 사용하였다. 건식 톨루엔과 디클로로메탄을 건조하고 용매 용제 시스템(Vacuum Atmospheres, USA)을 사용하여 탈기한 후 즉시 수집하여 사용하였다. 중수 소화된 NMR 용매인 CDCl₃ 및 D₂O는 Cambridge Isotope Laboratories, Inc.에서 구입하였다. CHGE는 분자체 4A에서 건조 후 중합에 사용되었다.
- [0053] (2) 사이클로헥실옥시에틸글리시딜에테르(CHGE) 모노머 합성

[0054] [반응식 1]



[0055]

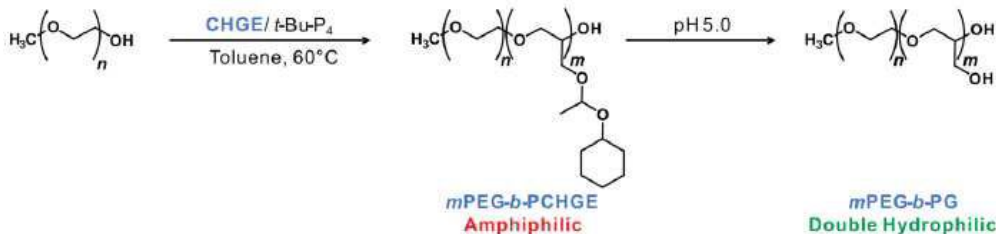
[0056] 디클로로메탄(200 mL)에 녹인 글리시돌(15.0 g, 0.202 mol)과 사이클로헥실비닐에테르(17.03 g, 0.135 mol) 용액을 둥근 바닥 플라스크에 넣고 실온에서 30 분 동안 교반하여 혼합용액을 제조하였다. 상기 혼합용액에 p-톨루엔 설폰산(0.23g, 1.35 mmol)을 천천히 첨가하고, 0 °C에서 2 시간 동안 교반하였다. 그 다음 포화 NaHCO₃ 용액을 추가로 첨가한 후 혼합용액을 1 시간 동안 교반하였다. 그 다음 상기 혼합용액의 수상을 디클로로메탄으로 추출하고 유기층을 탈이온수로 추출하였다.

[0057] 수득된 유기층을 Na₂SO₄로 건조시켰다. 건조시킨 유기상을 감압 농축하고 잔류물을 용리액으로서 에틸 아세테이트/헥산(1 : 9 v/v)을 사용하는 플래쉬 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 22.98g (85 %)의 CHGE 모노머를 무색 액체로 얻었다. 그 다음, CHGE 모노머를 증류에 의해 추가로 정제하였다. CHGE 모노머의 성공적인 합성은 ¹H 및 ¹³C NMR, 상관 분광법 (COSY), 이중 핵 단일양자 상관(HSQC), 전기분무 이온화 질량 분석(ESI-MS)으로 확인하였다(하기 도 2 참조).

[0058] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.86 (qd, J = 5.2, 0.6 Hz, 1H), 3.81 (dd, J = 11.3, 3.3 Hz, 1H), 3.69 (dd, J = 11.4, 3.4 Hz, 1H), 3.60 - 3.49 (m, 1H), 3.41 (dd, J = 11.3, 6.0 Hz, 1H), 3.18 - 3.09 (m, 1H), 2.83 - 2.76 (m, 1H), 2.64 (dd, J = 5.1, 2.7 Hz, 1H), 2.60 (dd, J = 5.0, 2.7 Hz, 1H), 1.93 - 1.80 (m, 2H), 1.79 - 1.67 (m, 2H), 1.58 - 1.49 (m, 1H), 1.41 - 1.11 (m, 8H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 98.14, 98.04, 74.49, 74.34, 65.19, 64.34, 50.94, 50.87, 44.73, 44.60, 33.44, 33.34, 32.65, 32.54, 25.64, 24.39, 24.17, 20.81, 20.58. MS (m/z + Na⁺, ESI⁺) calcd for C₁₁H₂₀O₃, 223.14; found, 223.13

[0059] (3) mPEG-b-PCHGE 블록 공중합체 합성

[0060] [반응식 2]



[0061]

[0062] (상기 반응식 3에서, n은 114이고, m은 각각 10(Cy1), 30(Cy2) 또는 50(Cy3)이다.)

[0063] 블록 공중합체의 합성은 매크로개시제(macroinitiator)로 폴리(에틸렌글리콜)메틸에테르(mPEG)를 사용하였다. mPEG(1.0 g, 0.2 mmol)를 질소 흐름 하에 플라스크에 넣었다. 이어서 톨루엔(3.0 mL)을 플라스크에 첨가하고 혼합물을 70 °C에서 30 분 동안 교반하였다. 그 다음 n-헥산(0.8 M, 0.2 mmol) 중 0.25 mL의 t-BuP₄를 용액에 첨가하였다. 30 분 후 CHGE(2.0 g, 10.0 mmol)를 주사기 펌프를 사용하여 6 시간 동안 용액에 적가하였다. 60 °C에서 2 일간 교반한 후 벤조산(0.02 g, 0.2 mmol)을 첨가하여 중합을 종료하였다. 반응 혼합물을 디클로로메탄과 함께 알루미나 패드에 통과시켰다. 용액을 증발 건조시켜 각각 Cy3를 얻었다(표 1; 1.98 g)(수율: 71%). Cy3의 수평균분자량(Mn)은 다음 방정식을 사용하여 NMR 데이터(도 2)에서 계산된 대로 14,000 g/mol로 결정되었다. 이 외에 상기 mPEG(1.0 g, 0.2 mmol)과 CHGE(1.2 g, 6.0 mmol)를 혼합한 것을 제외하고, 위와 동일한 방법으로 Cy2를 수득하였다. 또한 상기 mPEG(1.0 g, 0.2 mmol)과 CHGE(0.4 g, 2.0 mmol)를 혼합한 것을 제외하고, 위와 동일한 방법으로 Cy1를 수득하였다.

[0064] 반복 단위 수(CHGE) = 45 (메틴(methine) 피크의 적분 값, 45H, 4.80 ppm 및 mPEG의 메틸, 3H, 3.38 ppm); Mn = (200.28 g/mol (CHGE 단량체의 분자량) x 45 (반복 단위 수)) + 5000 g/mol (mPEG의 분자량) = 14012 g/mol. NMR 통합의 오차 범위를 고려하여 Cy3의 Mn 값으로 14000 g/mol을 사용하였다.

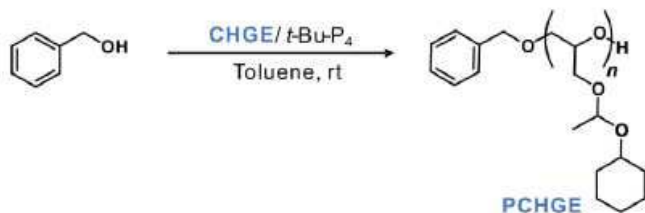
[0065] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4.85 - 4.74 (m, 45H), 3.96 - 3.40 (m, 734H), 3.39 (s, 3H), 1.86 (s, 94H),

1.73 (s, 92H), 1.61 - 1.47 (m, 44H), 1.42 - 1.09 (m, 385H).

[0066] 비교예 1

[0067] (3) PCHGE 호모폴리머 합성

[0068] [반응식 3]



[0070] (상기 반응식 3에서, n은 25 또는 50이다.)

[0071] n-헥산에 녹인 t-BuP₄ (0.80 M, 0.1 mmol) 0.125 mL 용액을 질소 분위기 하에서 톨루엔에 녹인 벤질 알코올 (10.4 μL, 0.1 mmol) 용액에 첨가하였다. 그 다음 CHGE (1.0 g, 5 mmol)를 주사기 펌프로 용액에 적가하여 6 시간에 걸쳐 중합하였다. 실온에서 24 시간 동안 교반한 후, 벤조산(12.2 mg, 0.1 mmol)을 첨가하여 중합을 중지시켰다. 이어서 급냉시킨 후 수득된 중합물을 디클로로메탄을 이용하여 알루미나 패드에 통과시켰다. 그 다음 상기 중합물을 증발 건조시켜 PCHGE(500 mg)를 얻었다(수율: 50 %). PCHGE₅₀(표 1)의 수평균분자량은 다음 방정식을 사용하여 도 2에 표시된 NMR 데이터에서 계산된 대로 10100 g/mol이었다.

[0072] 반복단위 수(CHGE) = 50 (메틴 피크의 적분 값, 50H, 4.78 ppm 및 벤질 알코올의 메틸렌, 2H, 4.53 ppm); Mn = (200.28 g/mol (CHGE 단량체의 분자량) × 50 (반복단위 수)) + 108.14 g/mol (벤질 알코올의 분자량) = 10122.14 g/mol. NMR 적분의 오차 범위를 고려하여 PCHGE₅₀의 Mn 값으로 10100 g/mol이었다. 이 외에 CHGE (0.5 g, 2.5 mmol)를 혼합한 것을 제외하고, 위와 동일한 방법으로 실시하여 PCHGE₂₅를 수득하였다

[0073] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : δ 4.79 (dd, J = 10.1, 6.4Hz, 50H), 4.54 (s, 2H), 3.78 - 3.34 (m, 312H), 1.84 (s, 105H), 1.72 (s, 109H), 1.52 (d, J = 7.1Hz, 53H), 1.40 - 1.07 (m, 438H).

[0074] 비교예 2 내지 4

[0075] 시중에 시판 중인 mPEG₁₁₄-b-PCHGE₆₀ (비교예 2, E60), mPEG₁₁₄-b-PCHGE₃₇ (비교예 3, P37) 및 mPEG₁₁₄-b-PCHGE₄₇ (비교예 4, F47)의 블록 공중합체를 각각 준비하였다.

[0076] 실험예 1: NMR 스펙트럼 분석

[0077] 상기 실시예 1 및 비교예 1에서 각각 제조된 CHGE 모노머, mPEG-b-PCHGE 블록 공중합체, PCHGE 호모폴리머의 ¹H NMR 스펙트럼을 분석하였으며, 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0078] 도 1은 상기 실시예 1 및 비교예 1에서 제조된 CHGE 모노머(a), PCHGE 호모폴리머(b) 및 mPEG-b-PCHGE 블록 공중합체(c)의 ¹H NMR 스펙트럼 분석 결과이다. 상기 도 1을 참조하면, 상기 비교예 1의 PCHGE 호모폴리머(b)의 경우 2.60, 2.80 및 3.15 ppm에서 단량체의 에폭시드 피크인 a 및 b의 소실에 의해 단량체가 중합체로 전환되었음을 나타내었다. 또한 벤질 양성자(x; 4.52 내지 4.55ppm), 폴리에테르 백본 양성자(a, b 및 c; 3.40 내지 3.75 ppm), 메틴 양성자(d; 4.75 내지 4.85 ppm), 및 메틸 및 사이클로헥실옥시 양성자(예: g, h 및 i, 1.10 내지 1.90 ppm)를 포함하여 PCHGE 단일 중합체의 다른 피크가 명확하게 나타나는 것을 확인하였다. 이론적 수평균 분자량(Mn, NMR)은 ¹H NMR 스펙트럼에서 벤질릭 양성자(benzylic proton)와 메틴 양성자(methine proton)의 적분 비율로 계산되었다.

[0079] 또한 상기 도 1의 (c)를 참조하면, mPEG-b-PCHGE 블록 공중합체의 ¹H NMR 스펙트럼은 구조에 따라 각 특징적인 피크를 명확하게 나타내었다: mPEG 매크로개시제의 메틸 양성자 (x; 3.38 ppm), 메틴 양성자 (d; 4.75 내지 4.80 ppm), 폴리에테르 백본 양성자 (y, z; 3.40 내지 3.75 ppm), 메틸 및 사이클로헥실옥시 양성자 (예: g, h 및 i; 1.10 내지 1.90 ppm). 양친성 블록 공중합체의 중합도(DP)는 CHGE의 메틴 피크(g; 4.75 내지 4.80 ppm)와 mPEG의 메틴 피크(3.38 ppm)의 비율로 결정되었다. 상기 실험예 1에는 명시하지 않았으나, mPEG-b-PCHGE 블록 공중합체의 GPC 결과는 모든 항목에서 좁은 분산도(D < 1.13)를 갖는 단일 모드 분포를 보여주었다.

[0080] 실험예 2: Mn, Tg 및 CMC 물성 분석

[0081] 상기 실시예 1 및 비교예 1 내지 4에서 각각 제조된 CHGE 모노머, mPEG-b-PCHGE 블록 공중합체, PCHGE 호모폴리머에 대하여 수평균분자량(Mn), 유리전이온도(Tg) 및 임계마이셀농도(CMC)를 측정하였다. 그 결과는 표 1에 나타내었다.

[0082] [측정방법]

[0083] 수평균분자량(Mn)은 ¹H NMR 분광법, cGPC (THF, RI 신호, PMMA 표준) 및 dGPC (DMF, RI 신호, PMMA 표준)로 측정하였다.

[0084] 유리전이온도(Tg)는 시차주사열량 측정법(DSC)에 의해 10 °C/min의 속도로 측정되었다. 임계마이셀농도(CMC) 값은 pyrene을 프로브로 사용하여 형광 분광법으로 계산되었다.

[0085] 임계마이셀농도(CMC)는 마이셀 형성을 위한 최소의 마이셀 형성 고분자 농도로서 마이셀의 안정성을 예측하는 중요한 매개 변수이므로 형광 프로브로 피렌을 사용하여 양친성 블록 공중합체의 CMC 값을 측정하였다. 자기조립 고분자 마이셀의 소수성 코어와 같이 피렌이 서로 가까이 있을 때 피렌의 특정 광 발광을 I339/ I332 (332 nm에서 339의 강도) 비율로 각 폴리머의 다양한 농도에 따라 플롯하였다. 피렌 형광법을 이용한 구체적인 임계마이셀농도(CMC) 측정 방법은 다양한 농도(0.001 mg/L 내지 1000 mg/L)에서의 디메틸포름아미드(DMF)에 있는 중합체 용액을 준비하였다. mPEG-b-PCHGE 블록 공중합체 용액에 10 μ l의 피렌 용액(DMF 중 5.2 mg/L)을 첨가하고 혼합물을 실온에서 30 분 동안 교반하였다. 이어서 주사기 펌프를 사용하여 총 5 mL의 탈이온수를 0.5 mL/min의 속도로 용액에 첨가하였다. 용액을 밤새 평형을 이루도록 두었다. 각 피렌 함유 고분자 마이셀 용액(다른 농도)의 형광은 1 \times 1cm 석영 셀에서 형광계를 사용하여 372 nm의 방출 파장에서 측정되었다. 다음 매개 변수가 선택되었다. 방출 파장 = 372 nm, 여기 파장 범위 = 300 - 360 nm, 데이터 간격 = 0.5 nm. 339 및 332 nm의 파장에서 형광 강도의 비율을 폴리머 농도에 대해 플롯하고 CMC를 변곡점에서 결정되었다.

표 1

Polymer code ^a	Polymer composition	$M_{n,NMR}^b$ (g mol ⁻¹)	$M_{n,GPC}^c$ (g mol ⁻¹)	M_w/M_n	T_g^e (°C)	CMC ^f (mg L ⁻¹)
	PCHGE ₂₅	5100	4000 ^c	1.07 ^c	-36.8	-
	PCHGE ₅₀	10100	2400 ^c	1.10 ^c	-31.5	-
Cy1	mPEG ₁₁₄ -b-PCHGE ₇	6400	3900 ^d	1.09 ^d	-35.3	9.49 \pm 2.61
Cy2	mPEG ₁₁₄ -b-PCHGE ₂₈	10600	3500 ^d	1.10 ^d	-30.9	2.47 \pm 0.34
Cy3	mPEG ₁₁₄ -b-PCHGE ₄₅	14000	2700 ^d	1.13 ^d	-28.6	1.64 \pm 0.18
E60 ^g	mPEG ₁₁₄ -b-PEEGE ₆₀	14700	14700	1.11	-59.0	10.3
P37 ^h	mPEG ₁₁₄ -b-PTPGE ₃₇	11800	11600	1.05	-17.0	9.79
F47 ⁱ	mPEG ₁₁₄ -b-PTFGE ₄₇	8900	15300	1.07	-28.0	113.6

[0086]

[0087] 상기 표 1의 결과에 의하면, 각 조성물의 중합 전환율은 99% 이상이었다. 상기 실시예 1의 경우 CHGE의 개수에 증가할수록 수평균분자량(M_n , _{NMR})이 증가하는 것을 확인하였다. 또한 상기 실시예 1의 CMC 값은 각각 9.49 \pm 2.61 (Cy1), 2.47 \pm 0.34 (Cy2) 및 1.64 \pm 0.18 mg/L (Cy3)이었다. 즉, 양친성 블록 공중합체의 CMC 값은 소수성 블록의 개수가 증가함에 따라 감소하였다. 특히, 상기 Cy2의 경우 CHGE 단량체 개수 대비 임계마이셀농도의 감지효율이 가장 우수한 것을 알 수 있었다. 또한 상기 비교예 2 내지 4의 경우 상기 실시예 1의 Cy2 및 Cy3과 비교하여 상대적으로 수평균분자량(M_n , _{NMR})이 낮은 수치를 보였으며, CMC 값에서는 E60 (10.3 mg/L), P37 (9.79 mg/L) 및 F47 (113.6 mg/L)이었으며, 상기 실시예 1의 Cy2 및 Cy3과 비교하여 높은 것을 확인하였다. 이를 통해, 상기 실시예 1의 경우 상기 비교예 2 내지 4에 비해 상대적으로 훨씬 낮은 CMC값을 나타내어 CHGE 단량체의 소수성이 큰 것을 알 수 있었다.

[0088] 한편, 유리전이온도(Tg)의 경우 상기 비교예 1의 PCHGE 호모폴리머에서 CHGE의 중합 정도가 증가함에 따라 -36.8 °C에서 -31.5 °C로 증가하였다. 이러한 결과로부터 CHGE의 사이클로헥실기(cyclohexyl)의 의자 대 의자(chair-to-chair) 적층이 많을수록 Tg 값이 높아질 수 있음을 알 수 있었다. 상기 실시예 1의 양친성 블록 공중합체도 마찬가지로 CHGE의 중합도가 증가함에 따라 고분자의 Tg 값은 -35 °C(Cy1)에서 -28 °C(Cy3)로 증가하였다. 또한 상기 mPEG-b-PCHGE의 Tg는 TFGE 블록 코폴리머의 Tg와 비슷하지만 TPGE 블록 코폴리머 보다 낮은 것을

확인하였다. 이는 CHGE의 사이클로헥실(cyclohexyl)기로 인해서 Tg가 증가되지만, TPGE 보다는 CHGE가 선형적인 구조라 TPGE의 Tg 보다 낮은 결과를 나타낸 것임을 알 수 있었다.

[0089] **실험예 3: MALDI-ToF 분광법 및 가수분해 반응 분석**

[0090] 상기 실험예 1, 2에서 NMR 및 GPC를 통해 상기 비교예 1의 PCHGE 호모폴리머의 합성을 확인한 후, MALDI-ToF 분광법을 수행하여 CHGE가 PCHGE 호모폴리머에 가교 결합되는지 확인하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0091] 도 2는 상기 실시예 1에서 제조된 mPEG-b-PCHGE 블록 공중합체에 대한 2750에서 4500 Da까지의 MALDI-ToF 질량 스펙트럼 분석 결과를 나타낸 것이다. 상기 도 2에서 각 기호는 측정 중 손상되지 않은 폴리머(빨간색 원) 및 부분적으로 분해된 폴리머 조각(파란색 삼각형 및 녹색 사각형)에 해당한다. 상기 도 2를 참조하면, MALDI-ToF 스펙트럼에서 3734.9 g/mol의 분자량은 벤질 알코올 개시제(108.06 g mol⁻¹), 18 개의 단량체 (200.14 g mol⁻¹)와 Na⁺를 반대 이온으로 구성하는 호모폴리머에 해당되며 측정 중 사이클로헥실옥시 그룹의 부분적인 분해로 인해 두 가지 유형의 작은 피크가 관찰되었다. 특히 주요 신호와 가벼운(minor) 신호의 간격은 기능성 CHGE 단량체의 분자량에 해당하여 중합이 성공적으로 이루어진 것을 알 수 있었다.

[0092] 상기 실시예 1에서 제조된 양친성 블록 공중합체의 자기조립 거동을 조사하기 전에 밀도 기능 이론을 사용하여 양자 역학적 계산을 통해 CHGE 단량체의 가수분해 역학을 조사하였고, 그 결과는 도 3에 나타내었다. 여기서, 가수분해 역학은 에톡시에틸 프로필에테르(EEPE), 테트라하이드로피라닐 프로필에테르(TFPE) 및 테트라하이드로피라닐 프로필에테르(TPPE)와 같은 아세탈기가 있는 다른 유형의 단량체들과 비교하였다.

[0093] 도 3은 다양한 모델 아세탈 측쇄 화합물(CHPE, TPPE, TFPE, EEPE)의 가수분해 반응 좌표의 에너지 다이어그램 (a)과 CHPE의 제안된 가수분해 메커니즘(b)을 개략적으로 나타낸 것이다. 상기 도 3에서 녹색 분자는 CHPE의 가수분해에 관여하는 물 분자이다. 또한 사이클로헥실옥시프로필에테르(cyclohexyloxy propyl ether)(CHPE)는 CHGE 단량체의 중합 후 형성된 측쇄 구조를 고려하여 새로운 모델 화합물로 합성된 것이다.

[0094] 상기 도 3을 참조하면, 첫 번째 단계에서는 양성자 에너지 장벽을 계산하기 위해 25개의 명시적 물 분자(25 H₂O)와 추가 양성자가 포함되었다. 양성자화 전후의 전이 상태 구조를 포함하여 가장 낮은 에너지 구조를 가진 모델 화합물의 최적화 된 구조가 얻어졌다. 특히, CHPE에 대해 물 분자의 외부 껍질을 양성자화하여 모델 화합물의 큰 소수성을 나타내었다. 이어서 CHPE 구조에서 산소와 양성자 사이의 고정된 거리에 따라 제한된 최적화로 반응에너지 장벽(ΔE)을 계산하였다. 반응성 에너지 프로파일은 O-H 결합 길이에 따른 모델 아세탈 화합물의 양성자를 보여 주었다. 또한 상기 CHPE (29.0 kcal/mol)는 상기 TPPE (24.2 kcal/mol), TFPE (11.2 kcal/mol) 및 EEPE (10.0 kcal/mol)를 포함한 다른 모든 단량체보다 양성자화에 대해 가장 높은 에너지 장벽(ΔE)을 나타내었다. 이는 CHPE가 다른 아세탈 모델 화합물보다 가장 높은 소수성을 가지고 있음을 의미한다.

[0095] 또한 각 단량체의 소수성은 계산 모델 ALOGPS 2.1과 함께 분배 계수(logP)를 사용하여 평가하였다. 계산된 logP 값은 2.93 (CHPE), 1.72 (TPPE) 및 1.31 (TFPE)²⁴이었으며, 이는 반응성 에너지 프로파일에서 관찰된 경향을 뒷받침한다.

[0096] 일반적으로 아세탈 결합의 전체 가수분해에는 (1) 양성자화 단계 및 (2) 결합절단 단계의 두 단계가 포함된다. 전체 가수분해의 속도결정 단계는 CHPE에 대해 29.0 kcal/mol의 가장 높은 값을 갖는 양성자화 반응인 것으로 관찰되었다. 그 다음 약 1.0 kcal/mol의 활성화 에너지 장벽을 통해 양성자화된 CHPE 화합물의 가수분해를 위해 두 개의 명시적인 물 분자를 사용하여 양성자화된 CHPE 화합물(즉, H⁺-CHPE; 도 4b)의 가수분해 단계에서 반응 에너지 장벽 및 전이 상태를 계산하였다. 이 과정은 양성자화 단계와 비교하여 상당히 낮은 에너지 장벽 (각각 0.37 kcal/mol 및 0.83 kcal/mol)을 포함하는 단일 전이상태로 H + -TFPE 및 H + -TPPE의 개환에 대해 유사하게 관찰되었다. 또한 H⁺-EEPE의 경우 C-O 결합 파괴에 대해 활성화 에너지 장벽이 관찰되지 않았으며, 이는 동시에 가수분해에 이어 양성자 화 단계가 이어진 것임을 의미한다.

[0097] 모델 화합물의 컴퓨터 분석에 동기를 부여하여 pH 5.0에서 아세트산나트륨 -d3/아세트산-d4 완충액의 산성 조건 하에서 현장 1H NMR 분광법에 의해 CHPE 모델 화합물의 가수분해를 수행하였다. 그러나 수성 완충액에서 CHPE 단량체의 용해도가 제한되어 다른 모델 아세탈 화합물과 달리 가수분해 모니터링을 방지하였다. 계산 결과와 함께 CHPE 모델 화합물의 높은 소수성으로 인해 CHPE 내 아세탈 그룹의 가수분해가 연장되었다.

[0098] **실험예 4: DLS 및 AFM 평가**

[0099] 상기 실시예 1에서 제조된 Cy1, Cy2 및 Cy3 마이셀에 대하여 동적광산란(DLS)과 원자간력 현미경(AFM)을 사용하

여 마이셀의 크기와 모양을 확인하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0100] 도 4는 상기 실시예 1에서 제조된 Cy1, Cy2 및 Cy3 마이셀의 강도 평균 유체 역학적 직경(Dh) 분포도(a-c)와 해당 라인 스캔 프로파일이 있는 Cy1, Cy2 및 Cy3 마이셀의 AFM 이미지(d-f)이다. 상기 도 4의 (a-c)를 참조하면, DLS 측정에서 수행된 모든 폴리머의 농도는 CMC 값(1 mg/mL) 이상이었다. 또한 DLS에서 측정된 각 마이셀의 유체 역학적 직경(Dh)은 26.72 ± 1.99 (Cy1), 85.06 ± 0.54 (Cy2) 및 118.56 ± 4.21 nm (Cy3)이었으며, CHGE 수가 증가함에 따라 직경이 증가하였다. 이를 통해 부피가 큰 소수성 단위(CHGE)의 증가로 인해 마이셀의 소수성 코어에 입체 장애가 존재하여 마이셀의 크기가 증가된 것임을 짐작할 수 있었다.

[0101] 또한 상기 도 4의 (d-f)를 참조하면, AFM 이미지에서 Cy1는 DAFM = 55.16 ± 1.8 nm, Cy2는 DAFM = 91.27 ± 2.3 nm 및 Cy3는 DAFM = 130.89 ± 1.4 nm로 각각 마이셀의 구형 모양과 일정한 직경 분포를 나타내었으며, 이는 상기 DLS 결과와 유사한 수준을 나타냄을 확인하였다.

[0102] 실험예 5: 캡슐화 효율 평가

[0103] 상기 실시예 1에서 제조된 Cy1, Cy2 및 Cy3 마이셀과 비교예 2 내지 4의 E60, P37, F47에 대하여 마이셀의 캡슐화 효율을 평가하였으며, 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[0104] 마이셀의 캡슐화 효율(EE)을 다음과 같이 측정하였다. 모델 소수성 염료인 0.1 mL의 Nile Red 용액 (아세톤 중 $50 \mu\text{g/mL}$)을 아세톤 (0.1 mL) 중 mPEG-b-PCHGE 블록 공중합체 (5 mg) 용액에 첨가하고 혼합물을 실온에서 30 분 동안 교반하였다. 총 5 mL 탈이온수를 주사기 펌프를 사용하여 0.5 mL/min의 속도로 용액에 첨가하였다. 그 후 용액을 밤새 평형을 이루도록 두었고, 뚜껑을 열어 아세톤을 증발시켰다. 언로드된 Nile Red를 제거하기 위해 $0.45 \mu\text{m}$ 주사기 필터를 사용하여 여과한 후 용액을 동결 건조하고, 1.0 mL 아세톤에 재용해시켰다. 마이셀에 캡슐화된 Nile Red의 양은 $1 \times 1\text{cm}$ 석영 셀에서 형광계를 사용하여 측정하였고, 하기 계산식 1에 의해 캡슐화 효율(EE)을 계산하였다.

[0105] [계산식 1]

$$EE(\%) = \frac{\text{Concentration of Nile Red measured}}{\text{Concentration of Nile Red added}} \times 100$$

[0106]

[0107] 도 5는 상기 실시예 1의 Cy1, Cy2 및 Cy3과 비교예 2 내지 4의 E60, P37, F47에서 Nile Red의 캡슐화 효율(a)과 상기 Cy1, Cy2 및 Cy3의 캡슐화 효율에 대한 실제 이미지(b)를 각각 나타낸 것이다. 상기 도 5를 참조하면, 상기 실시예 1의 Cy1, Cy2 및 Cy3은 각 마이셀 코어에서 Nile Red의 부하 효율이 20.35 % (Cy1), 57.59 % (Cy2) 및 61.47 % (Cy3)이었다. 이는 기존 다른 연구(Biomacromolecules 2014, 15, (11), 4281-4292.)에서 캡슐화 효율은 최소 26 %에서 최대 53.5 %를 나타내어 상기 실시예 1의 CHGE 기반 마이셀보다 낮은 것을 확인하였다. 또한 기존 연구와 비교하여 아세탈 함유 고분자를 사용한 비교예 2 내지 4의 E60, P37, F47은 10.9 % (E60), 16.6 % (P37) 및 9.8 % (F47)로 CHGE-기반 마이셀은 코어의 소수성 상호 작용이 증가한 결과임을 알 수 있었다. 또한 마이셀의 로딩 효율은 CHGE 단량체 단위가 증가함에 따라 증가하고, Cy2에서 포화되어 CMC 값과 잘 일치하였다. 이를 통해 고분자에 소수성이 높고 부피가 큰 CHGE 모노머를 도입하면 로딩 효율이 우수한 마이셀을 형성할 수 있음을 확인하였다.

[0108] 실험예 6: 산성 환경에서의 분해속도 평가

[0109] 고분자 마이셀은 약물 전달체로 유망하지만 마이셀의 안정성은 생물학적 적용에 여전히 어려움을 겪고 있다. 특히 순환 중에 접할 수 있는 다양한 생물학적 물질을 고려하였을 때, 소수성 약물의 캡슐화는 혈액 내 다양한 단백질의 영향을 받는다. 이를 위해 상기 실시예 1에서 제조된 Cy1, Cy2, Cy3과 비교예 2 내지 4의 E60, P37, F47을 pyrene 형광법에 기반한 약물방출 프로파일에 적용하여 다양한 환경(FBS, PBS, pH 5.0 및 pH 7.4)에서 마이셀의 분해속도를 평가하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

[0110] 도 6은 상기 실시예 1에서 제조된 Cy1, Cy2, Cy3과 비교예 2 내지 4의 E60, P37, F47을 이용하여 pyrene 형광법에 기반한 약물방출 프로파일의 도식화(a) 및 화학구조 변화(b)와 pH 5.0 및 pH 7.4에서의 피렌이 로딩된 상기 실시예 1에서 제조된 Cy1, Cy2, Cy3과 비교예 2 내지 4의 E60, P37, F47를 이용한 마이셀의 약물방출 동역학(c, d)을 분석한 결과를 나타낸 것이다. 상기 도 6의 (a, b)를 참조하면, 상기 실시예 1의 양친성 블록 공중합체가 마이셀 형태로 존재하다가, 용매 속의 물 분자에 의해 아세탈 결합(acetal bond)이 양성자화(protonation)되면서 스웰링(swelling) 현상이 발생하고, 폴리글리세롤(polyglycerol, PG) 형태로 가수분해(hydrolysis)

되면 마이셀이 분해되고, 약물이 방출되는 구조를 보여준다.

[0111] 상기 도 6의 (c, d)는 37 °C의 온도에서 산성(pH 5.0) 및 정상(pH 7.4) 환경에서의 I339/I332 형광 비율 강도 변화에 대해 피렌 함유 각 마이셀의 안정성을 모니터링한 결과이다. 상기 정상(pH 7.4) 환경에서의 마이셀 분해를 조사한 결과 상기 실시예 1의 Cy1 내지 Cy3 마이셀에서 I339/I332의 형광 비율 강도는 변하지 않았으며, 이는 상기 마이셀들이 pH 7.4 환경에서 안정적인 것을 의미하였다. 반면에 상기 산성(pH 5.0) 환경에서의 마이셀들은 CHGE 부분이 가수분해에 의해 친수성 선형 PG로 변화였고, 소수성/친수성 균형의 붕괴로 분해가 관찰되었다. 마이셀이 낮은 pH에 반응함에 따라 코어에 캡슐화된 피렌이 방출되고, Cy1이 가장 현저하게 감소하였으며, Cy2 및 Cy3도 강도가 시간이 지남에 따라 감소하였다. 또한 상기 비교예 2 내지 4의 E60, P37, F47의 경우 산성(pH 5.0) 환경에서 마이셀이 빠르게 분해됨으로 인해 시간에 따른 피렌 강도가 빨라 사라지는 것을 확인하였다.

[0112] 특히, 피렌의 방출 속도는 마이셀에서 더 많은 단위의 CHGE 단량체를 포함할 때 더 느리게 방출되었다. 예를 들어, Cy1은 4일 만에 가장 빠르게 분해되어 대부분의 피렌(pyrene)을 방출하였고, Cy2는 12일 후 완전히 분해되었으며, 가장 긴 14일 후에 완전히 분해되었다. 이러한 결과는 Cy1 내지 Cy3의 CMC 값과 일치하며, 방출 역학을 제어할 수 있음을 나타내었다. 또한 소수성 부위가 가장 큰 Cy3의 경우 코어에서 가장 강한 소수성 상호 작용을 가짐으로써 고밀도 패킹으로 인해 가장 긴 방출 시간을 보이며 장기간 지속 방출이 가능한 것을 알 수 있었다.

[0113] 실험예 7: 생물학적 환경(PBS 및 FBS)에서의 캡슐화 안정성 평가

[0114] 상기 실시예 1에서 제조된 Cy1, Cy2, Cy3에 대하여 다양한 생물학적 환경(PBS 및 FBS)에서 마이셀의 안정성을 조사하였다. FRET(fluorescence resonance energy transfer) 기반 방법은 생물학적 환경에서 마이셀의 안정성을 확인하는데 사용되었다. 마이셀의 안정성은 FRET 쌍의 DiO (FRET-기증자) 및 DiI (FRET-수용자)를 마이셀의 소수성 코어에 로딩하여 분석하였다. 참고로 마이셀이 가혹한 조건에서 안정하면 FRET 쌍이 코어 가까이에 위치하여 560 nm 근처에서 강한 방출이 발생하기 때문에 DiO (FRET-기증자)에서 DiI (FRET-수용자)로의 효율적인 에너지 전달이 발생한다. 그러나 마이셀이 불안정하면 FRET 쌍이 된다. 위치가 자유롭고 쌍 사이의 에너지가 전달되지 않으므로 510 nm에서 강한 DiO 방출 (FRET 기증자)만 나타난다. 분석 결과는 도 7에 나타내었다.

[0115] 도 7은 상기 실시예 1에서 제조된 Cy1, Cy2, Cy3에 대하여 형광 방출 스펙트럼($\lambda_{ex} = 450 \text{ nm}$)을 사용하여 PBS 및 FBS에서의 FRET 기반 캡슐화 안정성 분석 결과를 나타낸 것이다. 상기 도 7을 참조하면, Cy1, Cy2 및 Cy3 마이셀은 192 시간 동안 PBS(phosphate-buffer saline)에서 약 550 nm에서만 강한 방출을 보였으며 510 nm에서는 피크가 관찰되지 않았다. 앞서 설명한 바와 같이 마이셀의 코어에 DiO와 DiI가 근접해 있기 때문에, 이러한 결과는 효율적인 에너지 전달에서 비롯된 것임을 알 수 있으며, 마이셀이 PBS에서 우수한 안정성을 가지고 있음을 의미한다.

[0116] 또한 전체 측정시간 동안의 피크 변화는 Cy3 마이셀에서 거의 관찰되지 않았지만 Cy2와 Cy1 마이셀에서는 120 시간 후 더 큰 피크 변화가 관찰되었다. 이를 통해 소수성 단위의 수가 많을수록 코어의 DiO와 DiI가 조밀해져 마이셀 코어의 안정성이 높아지고 피크 변동이 관찰되지 않는 것을 알 수 있었다.

[0117] 아울러, 소 태아 혈청(FBS, fetal bovine serum)에 존재하는 단백질과 지질의 응집체 형성으로 인해 최대 72 시간까지 실험을 측정할 결과 72 시간 동안 모든 마이셀에서 550 nm에서 강한 방출이 관찰되었고, 510 nm의 피크 변화는 관찰되지 않았다. PBS 데이터와 마찬가지로 피크 변화는 Cy2와 Cy3이 아닌 Cy1에서만 관찰되었다. 이러한 결과는 모든 마이셀이 혈청의 단백질에 영향을 받지 않았으며 코어에서 페이로드를 안전하게 유지할 수 있음을 나타내었다. 또한 전체적으로 마이셀은 생물학적 환경에서 우수한 안정성을 보였고, 낮은 pH에 반응하여 열화됨을 확인하였다.

[0118] 실험예 8: 체내 세포 독성 평가

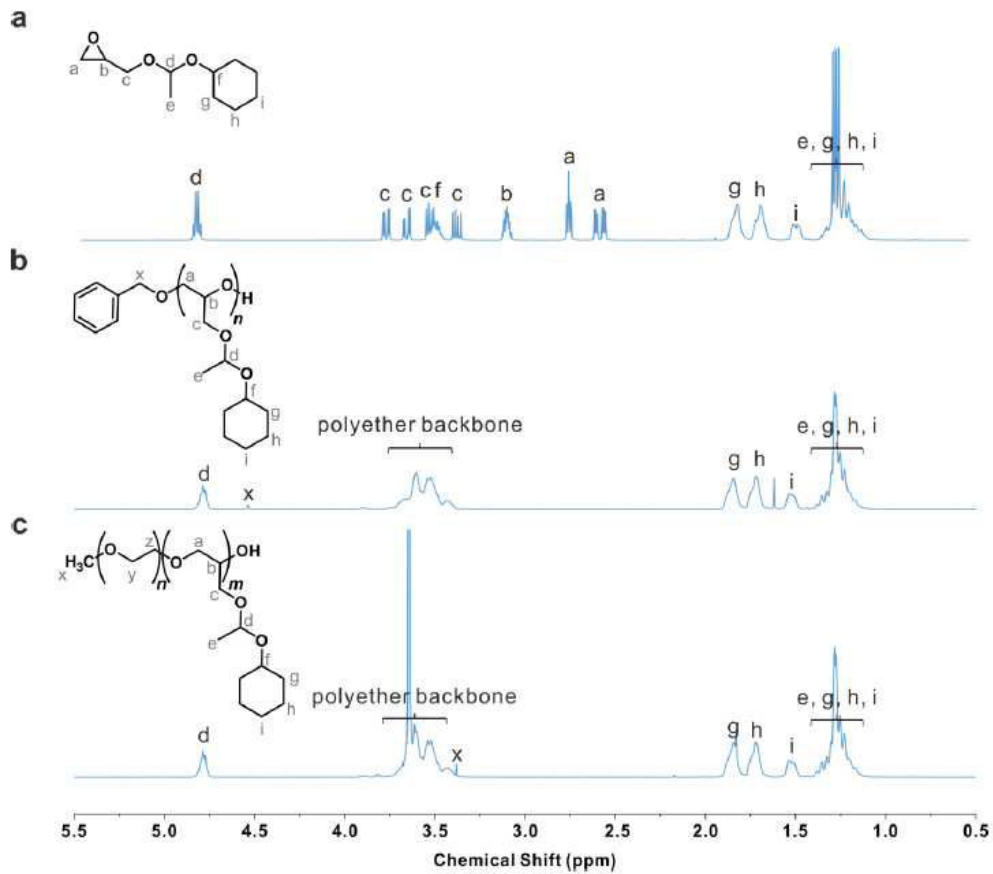
[0119] 상기 실시예 1에서 제조된 Cy1, Cy2, Cy3에 대하여 약물 전달 시스템에서의 적용 가능성을 평가하기 위해 마이셀의 세포 생존력 시험을 수행하였다. 특히 고분자 마이셀은 약물 전달체 적용을 위해 생체 적합성이 높아야 한다. 약물 전달체로 합성한 마이셀의 세포 생존력을 측정하기 위해 HeLa 세포에 대한 MTT 분석을 조사하였다.

[0120] 도 8은 상기 실시예 1에서 제조된 Cy1, Cy2, Cy3에 대하여 HeLa 세포를 사용한 MTT 분석에 의해 결정된 시험관 내 세포 생존력 분석 결과를 나타낸 것이다. 상기 도 8을 참조하면, 상기 Cy1, Cy2, Cy3의 경우 마이셀 용액을 다양한 농도로 처리하거나, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에 노출된 경우에도 세포 생존율은 모두 약 100 %를 유지하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 상기 Cy1, Cy2, Cy3의 각 양친성 블록 공중합체가 약물 전달 담체로 적용하기에 적합한 것을 의미한다. 즉, 상기 Cy1, Cy2 및 Cy3은 HeLa 세포에 대해 우수한 세포 생존력을 보임으로써 약물

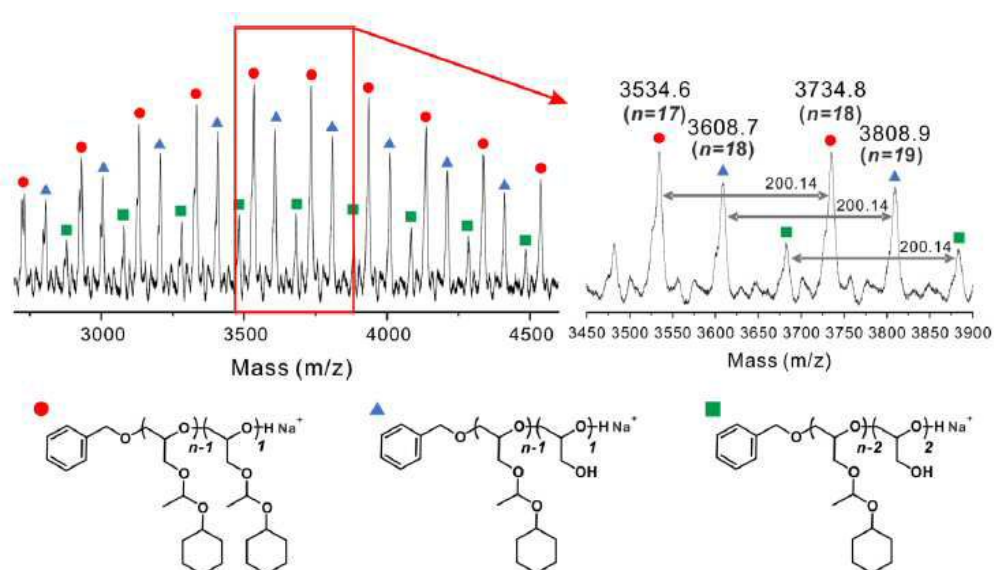
전달체로 적합함을 알 수 있었다.

도면

도면1

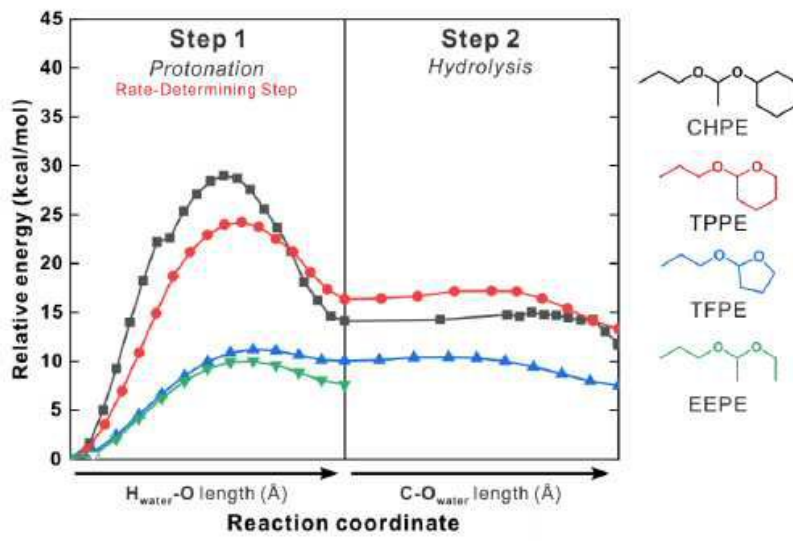


도면2

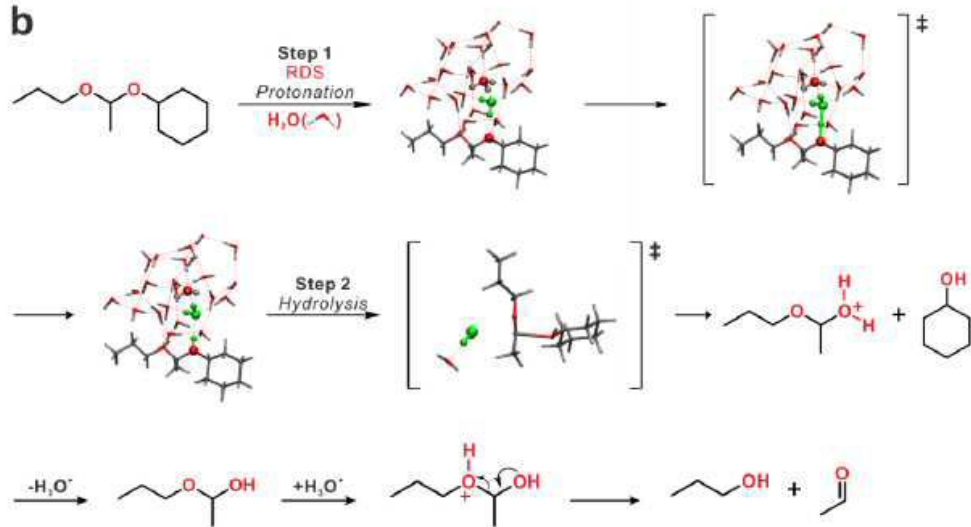


도면3

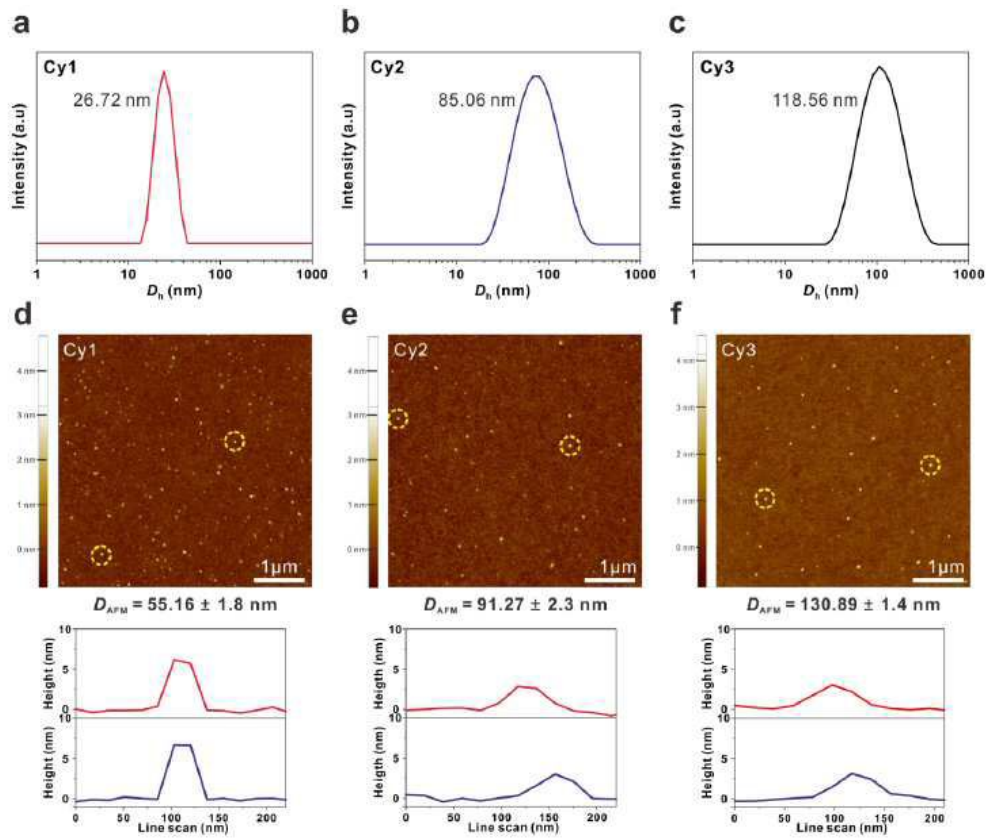
a



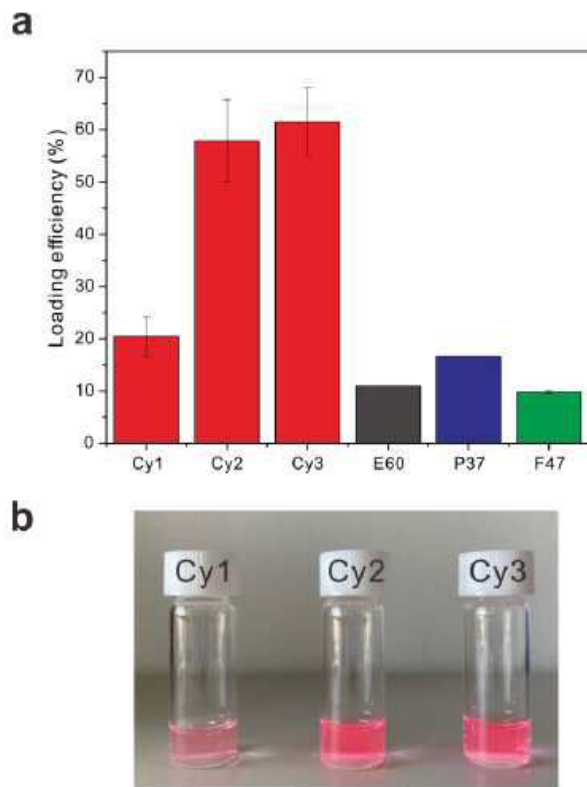
b



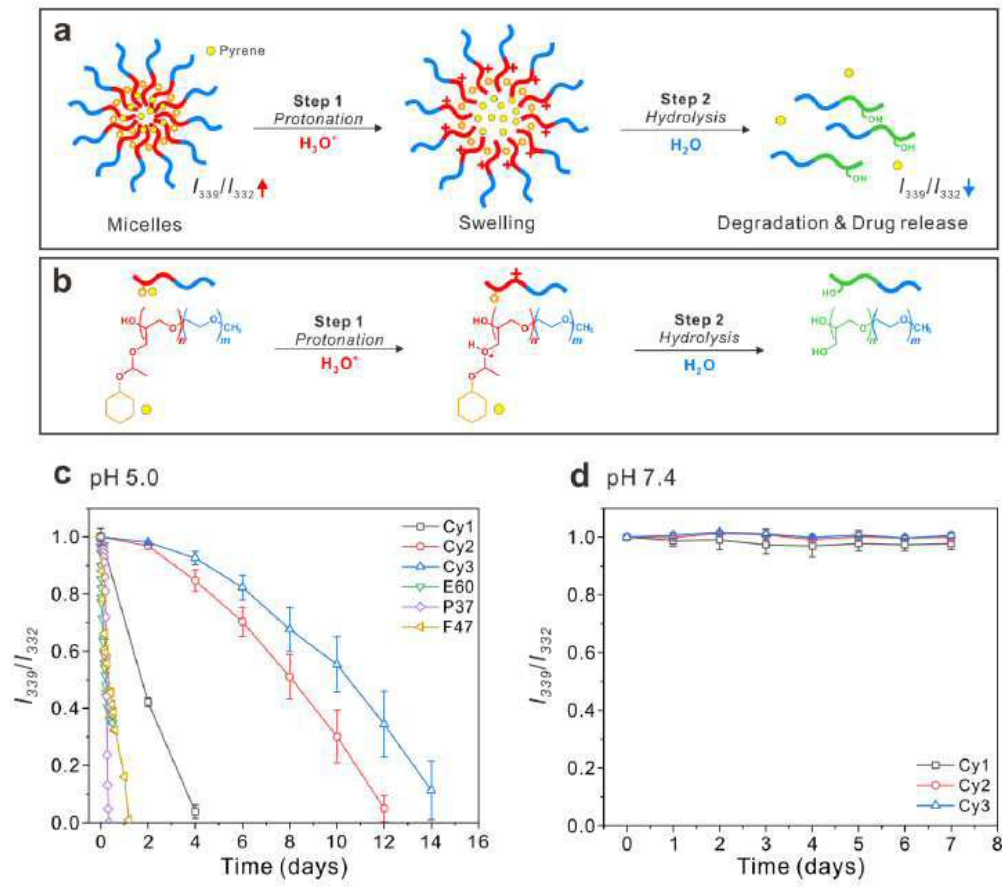
도면4



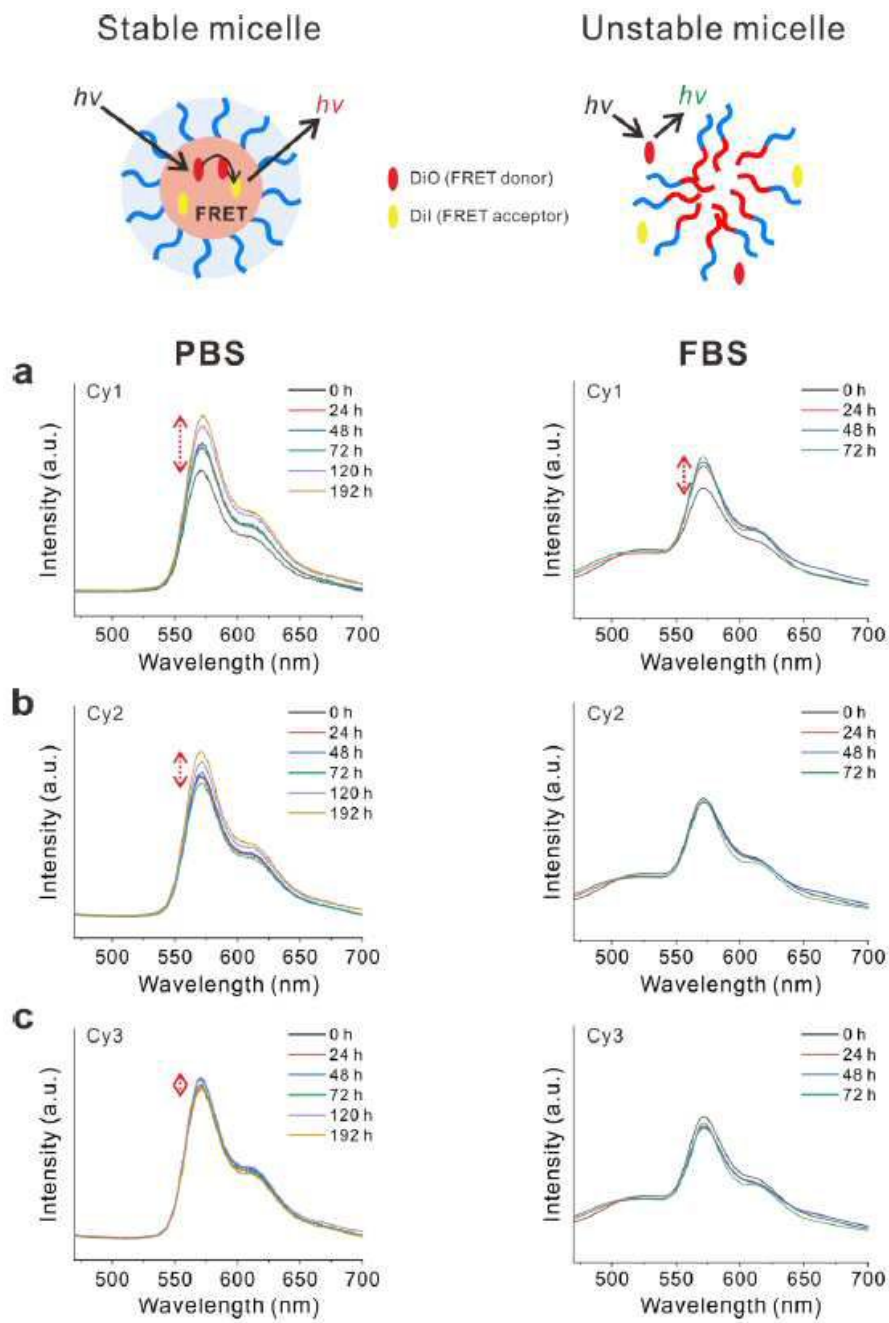
도면5



도면6



도면7



도면8

